

BAB III. METODELOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2019 sampai Oktober 2019. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian Peternakan, Universitas Muhammadiyah Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah pisau, talenan, timbangan, baskom, panci, kompor, kertas label, loyang, *cabinet dryer*, sendok, desikator, *stopwatch*, *handphone*, *thermometer*, blender, tumbukan kayu, ayakan, spatula, batang pengaduk, labu ukur, timbangan analitik merk *Ohaus Pioneer* PA413, *rotary evaporator* merk Heidolph Laborota 4001 WB, Erlenmeyer, kertas saring Whatman no.41, *Vacuum pump* merk vacuum brand ME 2C, *vacuum filter flask*, corong *buchner*, botol kaca gelap, *showcase*, *aluminium foil*, loyang, corong, gelas ukur, *beaker glass*. Alat-alat yang digunakan dalam proses analisis adalah botol vial, *sentrifuse* merk Caliesys PLC Series, *tube sentrifuse*, spatula, kurs porselen, batang pengaduk, rak tabung reaksi, tabung reaksi, gelas ukur, pipet, mikropipet, *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, vortex, oven merk WTCV Binder type E53-898749, desikator *Glaswerk Wertheim* 6132, *spektrofotometer thermos spectronic* (GENESYS 20), lemari asam, *sharp microwave oven* R-728(w).

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah kacang panjang jenis usus yang masih berwarna hijau dan diperoleh dari pasar landungsari, air bersih, *aquades* diperoleh dari Lab Bioteknologi UMM, DPPH (2-2 *diphenyl* – 2 – *picrylhydrazil*), reagen *Folin-Ciocalteu*, Na_2CO_3 7,5%, AlCl_3 10%, NaOH 1N diperoleh dari Lab ITP

UMM, etanol 96%, NaNO_3 5% diperoleh dari toko kimia di Malang, gas nitrogen diperoleh dari toko gas di Malang.

3.3 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

3.3.1. Persiapan Sampel

Kacang panjang dicuci terlebih dahulu lalu dipotong-potong dengan panjang kurang lebih 2 cm lalu dibagi menjadi 6 untuk perlakuan selanjutnya yaitu kacang panjang segar, *steam blanding*, *water blansing*, pengeringan *sun drying*, pengeringan *cabinet drying* dan pengeringan *microwave*. Selanjutnya dilakukan penghalusan untuk mendapatkan sampel yang siap diekstrak.

3.3.2 Segar

Kacang panjang yang sudah dipotong-potong sebanyak 300 gram dihaluskan menggunakan tumbukan kayu dan didapatkan *puree* kacang panjang. Ditimbang sebanyak 250 gram lalu dimaserasi dengan 350 ml etanol 96% selama 72 jam.

3.3.3 Cabinet Drying.

Kacang panjang yang sudah dipotong-potong sebanyak 300 gram diletakkan di loyang. *Cabinet dryer* diseting dengan suhu 50°C dan kacang panjang dimasukkan ke dalam *cabinet dryer* selama 24 jam. Setelah itu dihaluskan menggunakan blender lalu dimaserasi dengan perbandingan 1:3 sebanyak 50 gram simplisia kacang panjang ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 150 ml selama 72 jam.

3.3.4 Sun Drying.

Kacang panjang yang sudah dipotong-potong sebanyak 300 gram diletakkan di loyang. Letakkan loyang di tempat yang terkena sinar matahari selama 72 jam. Setelah kering dihaluskan menggunakan blender lalu dimaserasi dengan

perbandingan 1:3 sebanyak 50 gram simplisia kacang panjang ditambahkan pelarut ethanol 96% sebanyak 150 ml selama 72 jam.

3.3.5 Pengeringan Microwave.

Kacang panjang yang sudah dipotong-potong sebanyak 250 gram diletakkan di loyang. Kemudian dikeringkan di dalam microwave dengan suhu 150°C selama 100 menit. Setelah kering dihaluskan menggunakan blender lalu dimaserasi dengan perbandingan 1:3 sebanyak 50 gram simplisia kacang panjang ditambahkan pelarut ethanol 96% sebanyak 150 ml selama 72 jam.

3.3.6 Steam Blansing

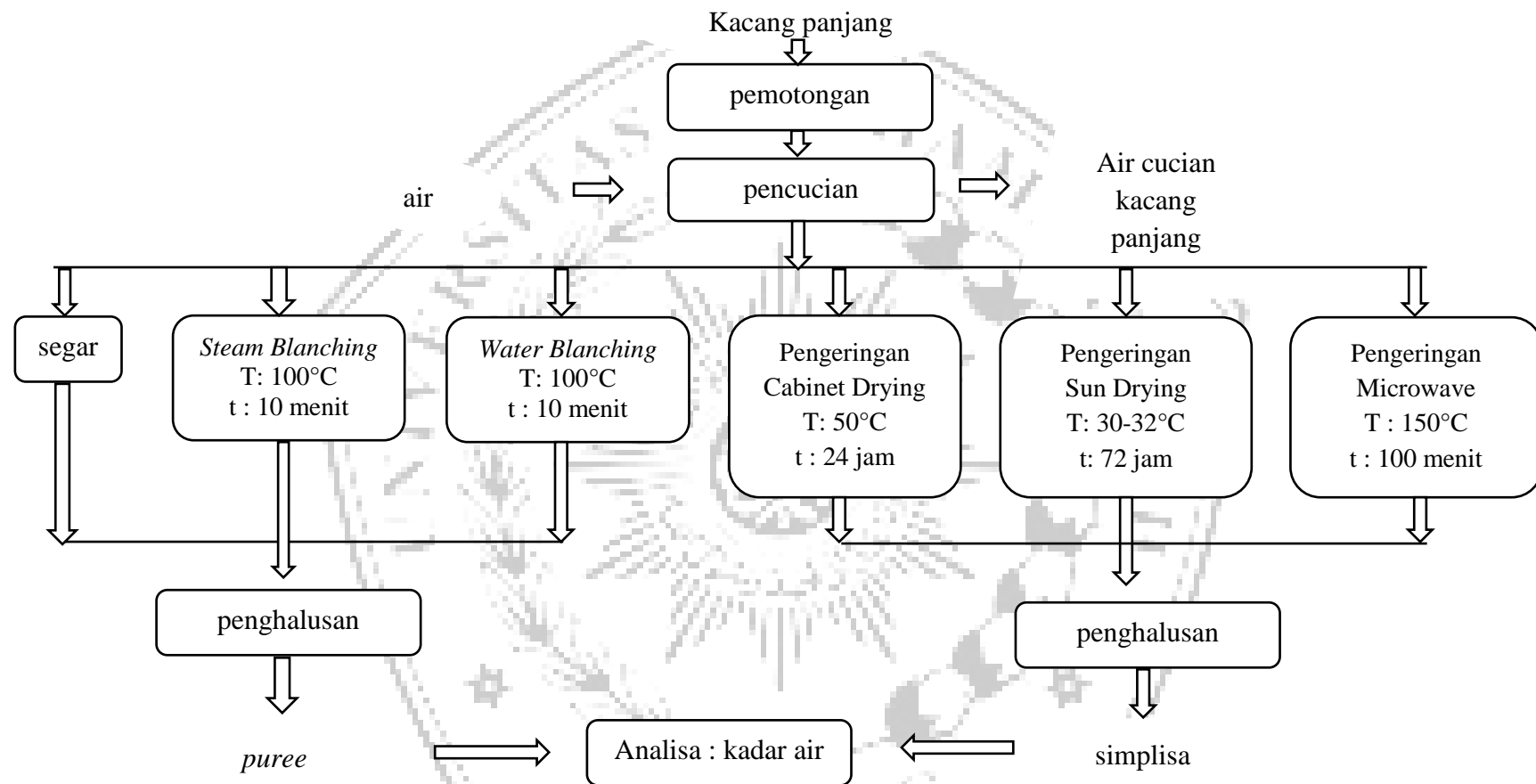
Kacang panjang yang sudah dipotong-potong sebanyak 300 gram disiapkan. Panaskan air dalam panci kukus hingga mendidih (100°C), lalu masukkan kacang panjang dan kukus selama 10 menit. Setelah itu dihaluskan dan ditimbang sebanyak 250 gram lalu dimaserasi dengan 350 ml ethanol 96% selama 72 jam.

3.3.7 Water Blansing

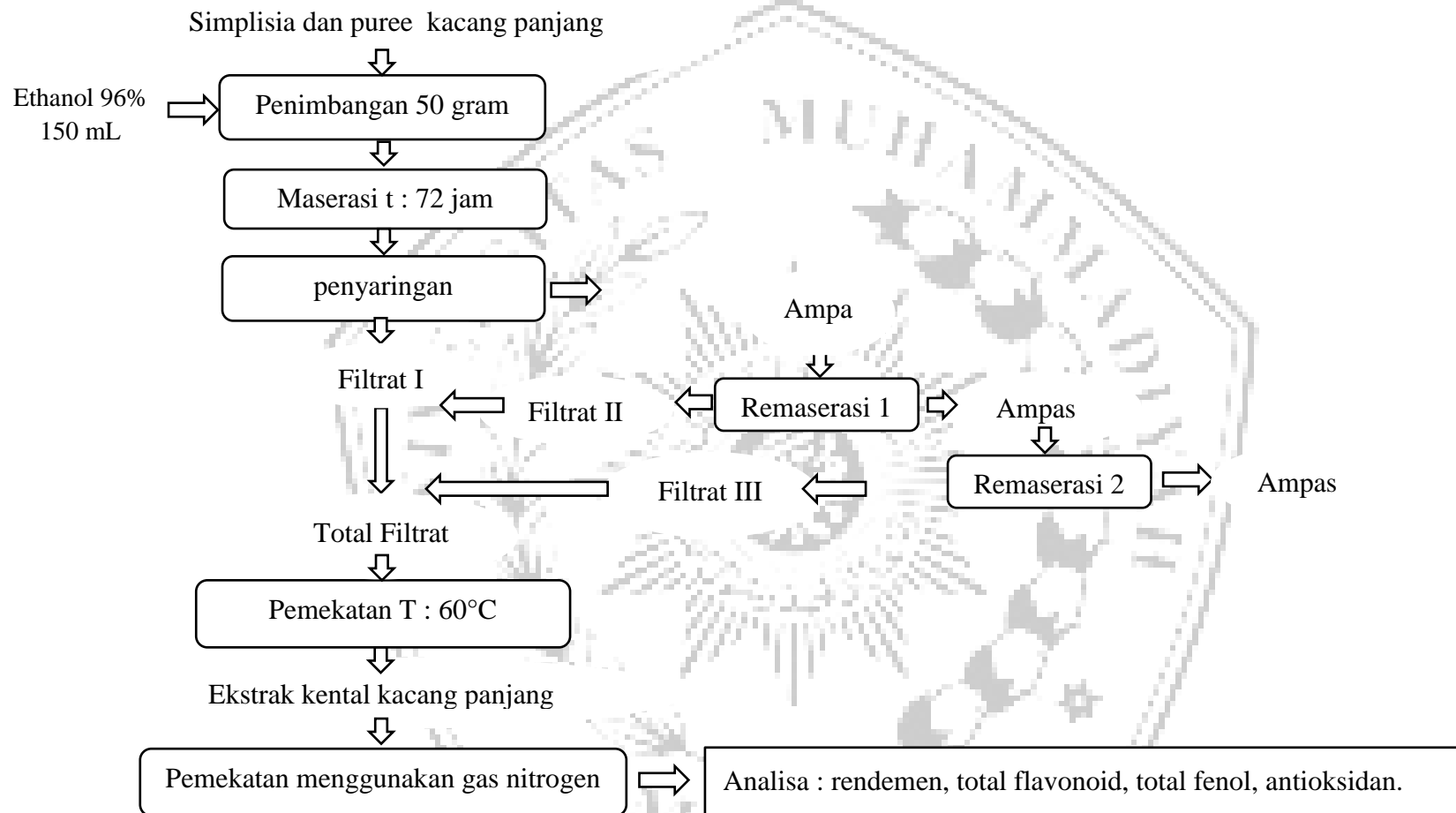
Kacang panjang yang sudah dipotong-potong sebanyak 300 gram disiapkan. Panaskan air dalam panci hingga mendidih (100°C) lalu masukkan kacang panjang dan rebus selama 10 menit. Setelah itu dihaluskan dan ditimbang sebanyak 250 gram lalu dimaserasi dengan 350 ml ethanol 96% selama 72 jam.

3.3.8 Ekstraksi sampel

Simplisia kacang panjang sebanyak 50 gram dimaserasi menggunakan pelarut ethanol 96% dengan perbandingan 1:3 selama 72 jam. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring, dihasilkan filtrat simplisia dan ampas simplisia. Ampas diremaserasi sebanyak 2 kali dan filtrat yang dihasilkan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* menggunakan suhu 60°C dengan tekanan yang rendah dan didapatkan ekstrak kental kacang panjang



Gambar 1 Diagram pembuatan sampel kacang panjang berbagai pengolahan (Indraswari, 2010) dengan modifikasi



Gambar 3 Diagram alir ekstraksi kacang panjang berbeda pengolahan (Indrawari, 2010) dengan modifikasi

3.4 Parameter Pengamatan

3.4.1 Analisa Kadar Air (Andarwulan dkk, 2011)

1. Botol vial ditimbang
2. Botol vial yang telah ditimbang dimasukkan kedalam oven selama 24 jam dengan suhu 100°C – 105°C
3. Botol vial didinginkan dalam desikator selama 15 menit
4. Botol vial ditimbang untuk mendapatkan berat botol
5. Sampel ditimbang ± 2 g dalam botol vial
6. Sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C – 105°C selama 6 Jam
7. Sampel didinginkan didalam desikator selama 15 menit
8. Sampel ditimbang sebagai bobot akhir sampel
9. Kadar air dihitung berdasarkan persamaan berikut :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat awal} - \text{berat botol}} \times 100\%$$

3.4.2 Analisa Rendemen

1. Simplisia dan *puree* yang akan diekstrak ditimbang sebanyak 50 gram (berat kering)
2. Proses maserasi dilakukan dengan menambahkan pelarut perbandingan (1:3) dengan waktu maserasi yang telah ditentukan.
3. Pelarut dan ampas dipisahkan
4. Pelarut diuapkan dengan senyawa yang telah diekstrak
5. Berat akhir ekstrak ditimbang
6. Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia dan puree}} \times 100\%$$

3.4.3 Analisis Kadar Flavonoid

1. Sampel ditimbang sebanyak 15 mg kemudian dilarutkan dalam 10 mL etanol sehingga diperoleh konsentrasi 1500 ppm
2. Larutan diambil sebanyak 1 mL dari ekstrak yang telah dibuat kemudian menambahkan 1 mL larutan AlCl_3 10% 0,1 mL, natrium asetat 1 M sebanyak 0,1 mL, dan 2,80 mL aquades
3. Larutan dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit
4. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 510 nm
5. Kadar total flavonoid diukur dengan rumus:

$$\text{flavonoid} = \frac{x \cdot FP \cdot \text{Volume Kuvet}}{\text{Berat Bahan}}$$

3.4.4 Analisis Kandungan Total Fenol Metode *Folin-Ciocalteu* (Orak, 2006)

1. Sampel ditimbang sebanyak 100 mg kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades sehingga diperoleh konsentrasi 10 mg/mL
2. Larutan diambil sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 10 mg/mL dan diencerkan dengan aquades sampai 10 mL dan diperoleh konsentrasi 1 mg/mL
3. Ekstrak diambil sebanyak 0,2 mL kemudian ditambahkan aquades 15,8 mL dan 1 mL reagen *Folin-Ciocalteu* lalu dihomogenkan
4. Larutan didiamkan selama 8 menit kemudian ditambahkan 3 mL Na_2CO_3 10% dalam campuran
5. Larutan didiamkan selama 2 jam dalam suhu ruang
6. Serapannya diukur dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 765 nm
7. Kadar fenol total dihitung dengan rumus:

$$\text{total fenol} = \frac{x \cdot FP \cdot \text{Volume Kuvet}}{\text{Berat bahan}}$$

3.4.5 Analisis Aktivitas Antioksidan dengan Metode *Radical Scavenging Activity* (RSA) (Yue dan Xu, 2008)

1. Sampel dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 1 mL
2. Etanol 95% ditambahkan sebanyak 5 mL, kemudian di vortex untuk membantu melarutkan sampel
3. Ekstrak disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan ekstrak
4. Supernatan diambil 4 ml kemudian ditambahkan dengan 1 mL larutan DPPH (2-2 diphenyl-2-picrylhidrazil) 0,2 mM
5. Sampel disimpan dalam ruangan gelap selama 20 menit
6. Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 517 nm dan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Antioksidan} = \frac{\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs blanko}} \times 100\%$$